

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-18840

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)3月6日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447		7363-2J	G 0 1 N 27/ 26	3 1 5 H

発明の数1 (全 3 頁)

(21) 出願番号	特願昭60-130324	(71) 出願人	999999999 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(22) 出願日	昭和60年(1985)6月14日	(72) 発明者	秋山 純一 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内
(65) 公開番号	特開昭61-288148	(72) 発明者	西根 勲 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内
(43) 公開日	昭和61年(1986)12月18日	(74) 代理人	弁理士 野河 信太郎
		審査官	能美 知康
		(56) 参考文献	特開 昭58-193446 (J P, A)

(54) 【発明の名称】 二次元電気泳動方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】一次元目の電気泳動用ゲルと二次元目の電気泳動用ゲルを液状の絶縁帯を介して上下に隣接させ、一次元目の電気泳動用ゲルにおいて一次元目の電気泳動をおこない、一次元目の電気泳動の終了後に前記液状の絶縁帯を泳動可能材料よりなる導電帯に置換して両ゲルを実質的にかつ電氣的に接続し、その状態において二次元目の電気泳動をおこなうことを特徴とする二次元電気泳動方法。

【発明の詳細な説明】

(イ) 産業上の利用分野

この発明は二次元電気泳動方法に関する。

(ロ) 従来の技術

従来、二次元電気泳動においては、一次元目の電気泳動終了後に、一次元目のゲルをガラスチューブから押し出

してフリーの状態にした後に移動させて二次元目のゲルの泳動開始側に接合していた。

(ハ) 発明が解決しようとする問題点

しかし、一次元目のゲルをチューブから取り出し、二次元目のゲルに正常な状態に接合するには非常な熟練度を必要とし、一次元目のゲルはその操作時に破断し、延伸し、あるいは折曲するおそれがあった。

この発明は上記の点に鑑みてなしたもので、一次元目のゲルを取り出すことなく次の二次元目の電気泳動をおこなうことができる二次元電気泳動方法を提供することを主要目的とする。

(ニ) 問題点を解決するための手段

この発明は、一次元目のゲルと二次元目のゲルとを上下に隣接させ、これらの間に液状の絶縁帯、導電帯を適宜介することにより、両ゲルを相対的な固定位置にとどめ

B4

た状態において一次元目、二次元目の電気泳動をなすようにしたもので、そのさらに詳しい構成は、一次元目の電気泳動用ゲルと二次元目の電気泳動用ゲルを液状の絶縁帯を介して上下に隣接させ、一次元目の電気泳動用ゲルにおいて一次元目の電気泳動をおこない、一次元目の電気泳動の終了後に前記液状の絶縁帯を泳動可能材料よりなる導電帯に置換して両ゲルを実質的にかつ電気的に接続し、その状態において二次元目の電気泳動をおこなうことを特徴とする二次元電気泳動方法である。

(ホ) 作用

液状の絶縁帯の存在によって両ゲルが上下にかつ絶縁状態に保たれた状態において一次元目の電気泳動がなされ、導電帯の存在によって両ゲルが実質的にかつ電気的に接続された状態において二次元目の電気泳動がなされる。

(ヘ) 実施例

以下この発明を図面によって詳述するが、この発明は以下の実施例に限定されるものではない。

まず第1図はこの発明に用いるゲルカセット(X)の分解構成を示し、第2図はその正面構成を示している。

(1)が基板、(2)が表面板で、略同形の長方形形状である。基板(1)は熱伝導性材料よりなり、電気泳動時に発生する熱を逃がす、いわゆる冷却機能を果すものである。表面板(2)としては適宜透明、不透明のプラスチック板を用い、表面板(2)と基板(1)とはスペーサ(3)を介して積層され、図示していないが例えば万力のような固定具によって固定される。スペーサ

(3)もプラスチック製で、両側部(4)(4)と傾斜凹部(5)を有する下部(6)とからなり、その前後面が基板(1)と表面板(2)との間の両側部と下部の位置に当接する状態とされて介在される。(7)は基板

(1)と表面板(2)とスペーサ(3)との密着性を高めるためのシール材であるシリコンラバーである。

上記のように基板(1)と表面板(2)との間にスペーサ(3)が介されることにより基板(1)と表面板

(2)の間には一定厚みを有する隙間空間(8)が形成される。

そして表面板(2)の上記隙間空間(8)の下端、すなわち、傾斜凹部(5)の最低部に対応する位置、さらには隙間空間(8)の上端の開口(9)より少し下方の両側に相対する位置にそれぞれ通孔(10)(11)(11)が設けられている。

以下上記ゲルカセット(X)を使用してのこの発明の二次元電気泳動方法を説明する。

まず通孔(10)を通して例えばポンプの駆動によって隙間空間(8)内に二次元目の電気泳動用のゲルの溶液を注入し、隙間空間(8)の2つの通孔(11)(11)を結ぶ位置(H)よりも下方に位置する一部分に二次元目の電気泳動用のゲルを形成する。この二次元目の電気泳動用のゲルとしては、例えばポリアクリルアミド濃度勾配

ゲルを用い、そのゲルはT(重量パーセント)=15%~5%、C(重量比)=4%、縦長さ×横長さが160mm×160mm、厚さが0.5mmの平板状である。ゲル溶液の注入はその液面が上記位置(H)に達する前にその位置(H)よりも10mm~20mm下のところで停止し、その後はゲル溶液より比重の大きい例えば60%グリセリン溶液を注入してさらに液面を高め上記位置(H)に至らす。この状態において傾斜凹部(5)に対応する隙間空間(8)にはグリセリン溶液が位置する。

上記の二次元目の電気泳動用のゲルの溶液を注入した後に、あるいは同溶液が固化したゲル化した後に、2つの通孔(11)(11)を通して、液状の絶縁帯となる絶縁液を1mmの高さになるように注入する。この絶縁液としては四塩化炭素、ポリハロゲン炭素液が使用される。この絶縁液層上にさらに上端開口(9)を通して一次元目の電気泳動用のゲルの溶液を注入する。この一次元目の電気泳動用のゲルとしては、同じくポリアクリルアミド濃度勾配用ゲルを用い、そのゲルはT=5.5%、C=4%、アンフォライン(LKB社)4%、サイズ5×160mm、厚さ0.5mmの平板状である。

上記のようにして第3図に示すような、約1mmの絶縁液(12)層をはさんで上下に一次元目の電気泳動用ゲル(13)と二次元目の電気泳動用ゲル(14)が配置されたゲル体がゲルカセット(X)内に構成される。このように、絶縁液(12)層を備える故に両ゲル(13)(14)は互いに電気的に影響を受けない。

この状態において上記ゲル体のA・Bに示す位置の電極間に電圧が印加され、一次元目の電気泳動用ゲルの所定位置に配置されたサンプルにおける一次元目の電気泳動がなされる。

そしてその泳動終了後に通孔(11)(11)を通して絶縁液(12)が抜かれ、そこに残る線状空間に融解したアガロースを注入し、固めて導電帯を形成する。アガロースは導電性で蛋白質を通すので、この状態において、一次元目の電気泳動用ゲル(13)と二次元目の電気泳動用ゲル(14)とが実質的にかつ電気的に接続された状態となる。そして次にC・Dに示す位置の電極間に電圧が印加されて二次元目の電気泳動がなされる。二次元目の電気泳動終了後に表面板(2)を取り外し分析結果を判別すべくゲルの染色をおこなう。

上記のアガロースに代えて例えばトリス・アミノメタンバッファー(pH8.6)を使用してもよいが、液層の厚みは3mm以下、適切には1mmとする。

なお、電極は実際には当然のことながらゲルカセット(X)のゲルの所定位置に相対する部分に適宜形成する。

(ト) 発明の効果

この発明に係る二次元電気泳動方法は、上述のように構成されていて、一次元目の電気泳動用のゲルを取り出すことなく二次元目の電気泳動用のゲルに接合できるの

で、従来のように一次元目の電気泳動用のゲルの損傷の心配もなく、きわめて操作性に優れる。また、この発明に係る二次元電気泳動方法は、一次元目の電気泳動用ゲルと二次元目の電気泳動用ゲルを液状の絶縁帯を介して上下に隣接させるようにしているので、両ゲルを板状部材やゲルカセットなどの内部に配する際に、両ゲル用溶液を互いに所定間隔をおいてあらかじめ固化またはゲル化させておく必要がなくなる。すなわち、板状部材などの内部に二次元目の電気泳動用ゲルを液体状態で導入しその固化またはゲル化の後に、絶縁帯となる絶縁液を所定量導入し、次いで一次元目の電気泳動用ゲルを液体状態で導入しその固化またはゲル化を待つことにより、両

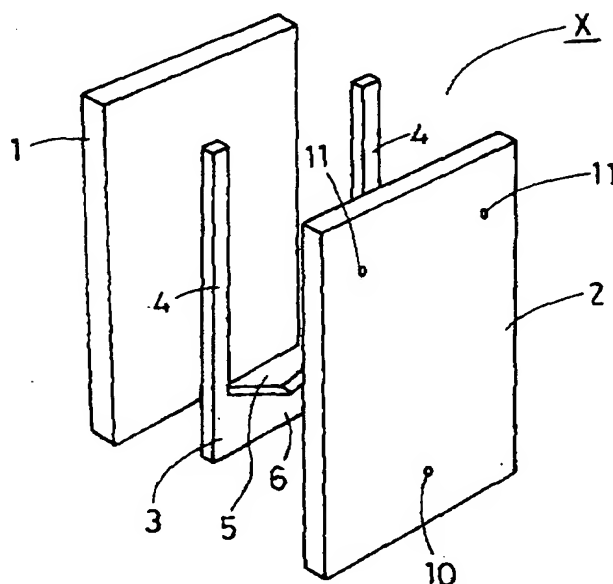
ゲルを互いに所定間隔をおいて配することが可能になる。したがって、両ゲル用溶液を互いに所定間隔をおいて固化またはゲル化させるための格別な装置や部材あるいは熟練が必要でなくなるばかりか、電気泳動要処理時間を短縮することができる。

【図面の簡単な説明】

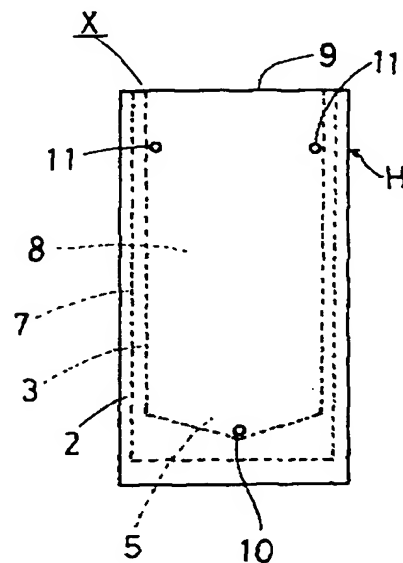
第1図はこの発明に用いるゲルカセットの実施例分解斜視図、第2図は実施例正面図、第3図はゲルカセット内に形成されるゲル体の実施例正面図である。

(X) ……ゲルカセット、(1) ……基板、(2) ……表面板、(3) ……スペーサ、(8) ……隙間空間、(10) (11) (11) ……通孔。

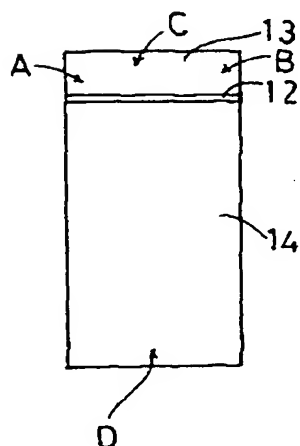
【第1図】



【第2図】



【第3図】



JAPANESE

[JP,07-018840,B]

<u>CLAIMS</u>	<u>DETAILED DESCRIPTION</u>	<u>DESCRIPTION OF DRAWINGS</u>	<u>DRAWINGS</u>
---------------	-----------------------------	--------------------------------	-----------------

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]
[Claim 1] The gel for electrophoresis of a single dimension eye and the second-dimensional gel for electrophoresis are made to adjoin up and down through a liquefied insulating band. Electrophoresis of a single dimension eye is performed in the gel for electrophoresis of a single dimension eye. The two-dimensional-electrophoresis approach characterized by permuting said liquefied insulating band by the conducting sleeve which consists of an ingredient it can be migrated, connecting both gels substantially and electrically, and performing the second-dimensional electrophoresis in the condition after termination of the electrophoresis of a single dimension eye.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

(b) Invention of ***** on industry relates to the two-dimensional-electrophoresis approach.

(b) After extruding the gel of a single dimension eye from the glass tube and changing into a free condition after electrophoresis termination of a single dimension eye in two dimensional electrophoresis conventionally [Prior-art], it was made to move, and it had joined to the gel's migration initiation side of the second-dimensional one.

(c) The gel of the trouble which invention tends to solve, however a single dimension eye was taken out from the tube, for joining to a normal condition, the extraordinary level of skill was needed for the second-dimensional gel, and the gel of a single dimension eye had a possibility of fracturing, extending or bending at the time of the actuation.

This invention is what was made in view of the above-mentioned point, and it sets it as the main purposes to offer the two-dimensional-electrophoresis approach that the following second-dimensional electrophoresis can be performed, without taking out the gel of a single dimension eye.

(d) Invention of ***** for solving a trouble By making the gel of a single dimension eye, and the second-dimensional gel adjoin up and down, and minding a liquefied insulating band and a conducting sleeve suitably among these It is what made a single dimension eye and the second-dimensional electrophoresis in the condition of having limited both gels to the relative fixed position. A configuration detailed to the pan The gel for electrophoresis of a single dimension eye and the second-dimensional gel for electrophoresis are made to adjoin up and down through a liquefied insulating band. Electrophoresis of a single dimension eye is performed in the gel for electrophoresis of a single dimension eye. It is the two-dimensional-electrophoresis approach characterized by permuting said liquefied insulating band by the conducting sleeve which consists of an ingredient it can be migrated, connecting both gels substantially and electrically, and performing the second-dimensional electrophoresis in the condition after termination of the electrophoresis of a single dimension eye.

(e) an operation -- existence of a liquefied insulating band -- both gels -- the upper and lower sides -- and the electrophoresis of a single dimension eye should do in the condition of having been maintained at the insulating condition -- in the condition that both gels were connected substantially and electrically, the second-dimensional electrophoresis is made by existence of a conducting sleeve.

(**) Although this invention is explained in full detail with a drawing below an example, this invention is not limited to the following examples.

First, Fig. 1 shows the decomposition configuration of the gel cassette (X) used for this invention, and Fig. 2 shows that transverse-plane configuration. (1) is a substrate, (2) is a faceplate and it is the rectangle configuration of abbreviation isomorphism. A substrate (1) consists of a thermally conductive ingredient, and the so-called cooling function which misses the heat generated at the time of electrophoresis is achieved. Suitably, using transparence and an opaque plastic sheet as a faceplate (2), the laminating of a faceplate (2) and the substrate (1) is carried out through a spacer (3), and although not illustrated, they are fixed by fastener like vice. By the product made from plastics, it consists of the lower part (6) which has the both-sides section (4), (4), and an inclination crevice (5), and it considers as the condition that the order side contacts the location of the both-sides section between a substrate (1) and a faceplate (2), and the lower part, and a spacer (3) intervenes. (7) is silicone rubber which is a sealant for raising the adhesion of a substrate (1), a faceplate (2), and a spacer (3).

When a spacer (3) minds between a substrate (1) and a faceplate (2) as mentioned above, between a substrate (1) and a faceplate (2), the clearance space (8) which has fixed thickness is formed.

And a through-hole (10), (11), and (11) are prepared in the location corresponding to the lower limit of the above-mentioned clearance space (8) of a faceplate (2), i.e., the bottom of an inclination crevice (5), and the location which faces downward both sides for a while from opening (9) of the upper limit of clearance space (8) further, respectively.

The two-dimensional-electrophoresis approach of this invention that uses the above-mentioned gel cassette (X) below is explained.

First, through a through-hole (10), the solution of the gel for the second-dimensional electrophoresis is poured in into clearance space (8) by the drive of a pump, and the gel for the second-dimensional electrophoresis is formed in the part caudad located from the location (H) which connects two through-holes (11) of clearance space (8), and (11). For example, that gel is plate-like [T(percentage by weight) = 15% - 5%, C(weight ratio) = 4%, and a longwise x oblong are / 160mmx160mm and plate-like thickness / 0.5mm, using polyacrylamide concentration gradient gel as gel for these second-dimensional electrophoresis]. Before the oil level arrives at the above-mentioned location (H), by the way, it stops under 10mm - 20mm from the location (H), and impregnation of a gel solution pours in for example, 60% glycerol [than a gel solution] solution with larger specific gravity after that, raises an oil level further, and is ***** to the above-mentioned location (H). A glycerol solution is located in the clearance space (8) corresponding to an inclination crevice (5) in this condition.

After pouring in the solution of the gel for [above] the second-dimensional electrophoresis, or after this solution's solidifying and gelling again, it lets two through-holes (11) and (11) pass, and the insulating liquid used as a liquefied insulating band is poured in so that it may become height of 1mm. As this insulating liquid, a carbon tetrachloride and poly halogen carbon liquid are used.

The solution of the gel for the electrophoresis of a single dimension eye is further poured in through upper limit opening (9) on this insulating solution layer. Similarly as gel for the electrophoresis of this single dimension eye, that gel is plate-like [with a size / of 5x160mm /, and a thickness of 0.5mm] ampholine (LKB) 4% T= 5.5% and C= 4% using the gel for polyacrylamide concentration gradients.

The gel object with which the gel for electrophoresis of a single dimension eye (13) and the second-dimensional gel for electrophoresis (14) have been arranged up and down on both sides of about 1mm insulating liquid (12) layer as shown in Fig. 3 as mentioned above is constituted in a gel cassette (X). Thus, because it is equipped with an insulating liquid (12) layer, both gels (13) and (14) do not receive effect electrically mutually.

An electrical potential difference is impressed to inter-electrode [of the location shown in A-B of the above-mentioned gel object in this condition], and the electrophoresis of the single dimension eye in the sample arranged in the predetermined location of the gel for electrophoresis of a single dimension eye is made.

and insulating liquid (12) should blunder through a through-hole (11) and (11) after the migration termination -- the line which remains there -- the agarose dissolved to space is poured in and hardened and a conducting sleeve is formed.

Since agarose lets protein pass by conductivity, in this condition, the gel for electrophoresis of a single dimension eye (13) and the second-dimensional gel for electrophoresis (14) will be in the condition of having connected substantially and electrically. And an electrical potential difference is impressed to inter-electrode [of the location shown in C and D below], and the second-dimensional electrophoresis is made. A faceplate (2) is removed after electrophoresis termination of the second-dimensional one, and gel is dyed that an analysis result should be distinguished.

Although it may replace with the above-mentioned agarose, for example, a tris aminomethane buffer (pH8.6) may be used, thickness of a solution layer is appropriately set to 1mm 3mm or less.

In addition, an electrode is suitably formed in the part which faces the predetermined location of the gel of a gel cassette (X) with a natural thing in fact.

Since it can join to the gel for the second-dimensional electrophoresis, without being constituted as mentioned above and taking out the gel for the electrophoresis of a single dimension eye, the two-dimensional-electrophoresis approach concerning invention of ***** of (g) invention does not have worries about damage on the gel for the electrophoresis of a single dimension eye like before, and is extremely excellent in operability. In case the two-dimensional-electrophoresis approach concerning this invention allots both gels to the interior, such as plate-like part material and a gel cassette, it becomes unnecessary moreover, to set predetermined spacing for the solution for both gels of each other, and to make it solidify or gel it beforehand, since he is trying to make the gel for electrophoresis of a single dimension eye, and the second-dimensional gel for electrophoresis adjoin up and down through a liquefied insulating band. That is, it becomes possible mutually about both gels to set and allot in predetermined spacing by carrying out specified quantity installation of the insulating liquid which introduces the second-dimensional gel for electrophoresis into the interior, such as plate-like part material, in the state of a liquid, and serves as an insulating band after the solidification or gelation, introducing the gel for electrophoresis of a single dimension eye in the state of a liquid subsequently, and waiting for the solidification or gelation. Therefore, about [that exceptional equipment, the member, or the level of skill for setting the solution for both gels of each other, and making predetermined spacing solidify or gel is less necessary] and the electrophoresis important point processing time can be shortened.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

It is the example front view of the gel object with which the example decomposition perspective view of a gel cassette which uses Fig. 1 for this invention, and Fig. 2 are formed in an example front view, and Fig. 3 is formed in a gel cassette.

(X) A gel cassette, (1) .. A substrate, (2) .. A faceplate, (3) [.. A spacer, (8)] [.. Clearance space, (10) (11), (11)] [.. Through-hole.]

[Translation done.]

